

BJS

食品补充检验方法

BJS 202303

食品中淫羊藿苷、金丝桃苷和补骨脂素的测定

2023-06-13 发布

国家市场监督管理总局 发布

食品中淫羊藿苷、金丝桃苷和补骨脂素的测定

1 范围

本方法规定了食品中淫羊藿苷、金丝桃苷和补骨脂素的液相色谱-串联质谱测定方法。

本方法适用于除碳酸饮料外的饮料、配制酒、火锅底料及保健食品中淫羊藿苷、金丝桃苷和补骨脂素的测定。

2 原理

试样经 70% 甲醇超声提取、离心后过滤膜,火锅底料以正己烷除脂,固相萃取柱净化后过滤膜。以液相色谱-串联质谱法测定,外标法定量。

3 试剂和材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

3.1 试剂

3.1.1 乙腈(CH_3CN):色谱纯。

3.1.2 甲醇(CH_3OH):色谱纯。

3.1.3 甲酸(HCOOH):色谱纯。

3.1.4 正己烷 $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3]$ 。

3.2 试剂配制

3.2.1 0.1% 甲酸水溶液:量取 1.0 mL 甲酸(3.1.3),加水稀释至 1 000 mL,混匀备用。

3.2.2 70% 甲醇溶液:量取 700 mL 甲醇(3.1.2)和 300 mL 水,混匀备用。

3.3 标准品

淫羊藿苷、金丝桃苷和补骨脂素标准品:纯度不低于 98%。标准物质中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子量和结构式见附录 A。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 淫羊藿苷标准储备液(1.0 mg/mL):准确称取 10 mg 标准品至小烧杯中,加少量甲醇(3.1.2)溶解,溶液定量移入 10 mL 容量瓶中,用甲醇(3.1.2)稀释至刻度,摇匀,制成浓度为 1.0 mg/mL 的标准储备液,4 °C 保存,有效期 3 个月。

3.4.2 金丝桃苷标准储备液(1.0 mg/mL):准确称取 10 mg 标准品至小烧杯中,加少量甲醇(3.1.2)溶解,溶液定量移入 10 mL 容量瓶中,用甲醇(3.1.2)稀释至刻度,摇匀,制成浓度为 1.0 mg/mL 的标准储备液,4 °C 保存,有效期 3 个月。

3.4.3 补骨脂素标准储备液(1.0 mg/mL):准确称取 10 mg 标准品至小烧杯中,加少量甲醇(3.1.2)溶

解,溶液定量移入 10 mL 容量瓶中,用甲醇(3.1.2)稀释至刻度,摇匀,制成浓度为 1.0 mg/mL 的标准储备液,4 ℃ 保存,有效期 3 个月。

3.4.4 混合标准中间溶液:分别准确量取 0.10 mL 补骨脂素标准储备液(3.4.3)、2.0 mL 淫羊藿苷标准储备液(3.4.1)和 1.0 mL 金丝桃苷标准储备液(3.4.2),置于同一 100 mL 容量瓶中,用甲醇(3.1.2)稀释至刻度,摇匀,制成的混合标准中间溶液中补骨脂素质量浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、淫羊藿苷质量浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、金丝桃苷质量浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。混合标准中间液 4 ℃ 保存,有效期 3 个月。

3.4.5 混合标准工作溶液:分别准确量取混合标准中间溶液(3.4.4)5 μL 、10 μL 、20 μL 、50 μL 、100 μL 、200 μL 、500 μL ,用 70%甲醇溶液(3.2.2)稀释并定容至 100 mL,作为混合标准工作溶液,临用新制。补骨脂素质量浓度依次为:0.05 ng/mL、0.10 ng/mL、0.20 ng/mL、0.50 ng/mL、1.00 ng/mL、2.00 ng/mL、5.00 ng/mL,淫羊藿苷质量浓度依次为:1.00 ng/mL、2.00 ng/mL、4.00 ng/mL、10.00 ng/mL、20.00 ng/mL、40.00 ng/mL、100.00 ng/mL,金丝桃苷质量浓度依次为:0.50 ng/mL、1.00 ng/mL、2.00 ng/mL、5.00 ng/mL、10.00 ng/mL、20.00 ng/mL、50.00 ng/mL。

3.5 材料

3.5.1 微孔滤膜:0.22 μm ,有机相型。

3.5.2 PRiMEHLB 固相萃取柱:6 mL,200 mg,或性能相当者。

4 仪器和设备

4.1 液相色谱-串联质谱仪,配有电喷雾离子源(ESI 源)。

4.2 电子天平:感量分别为 0.000 1 g 和 0.001 g。

4.3 离心机:转速 \geq 9 000 r/min。

4.4 超声波恒温水浴振荡器。

4.5 涡旋振荡器。

4.6 匀浆机。

4.7 粉碎机。

5 试样制备

5.1 固体饮料、固体火锅底料、半固体火锅底料及片剂、胶囊剂型保健食品

取适量代表性试样(胶囊取内容物)置粉碎机中粉碎、混匀,装入洁净容器中,密封并标记,按样品标示的保存条件保存备用。软胶囊样品,挤出内容物,混匀。牛油型火锅底料水浴加热融化后经匀浆机匀浆后立即取样。

5.2 液体饮料、配制酒及液体剂型保健食品

取适量试样,充分混匀,装入洁净容器中,密封并标记,按样品标示的保存条件保存备用。

6 测定步骤

6.1 试样处理

6.1.1 固体饮料及片剂、胶囊剂型保健食品

称取 1 g 试样(精确至 0.001 g)于 50 mL 离心管中,加入 25.0 mL 70%甲醇溶液(3.2.2),涡旋振荡

1 min, 超声提取 20 min, 9 000 r/min 离心 5 min, 上清液经微孔滤膜(3.5.1)过滤, 取过滤液, 待测。

6.1.2 液体饮料、配制酒及液体剂型保健食品

移取 1.0 mL 试样置于 25 mL 容量瓶中, 加 70% 甲醇溶液(3.2.2)定容至刻度, 涡旋振荡 1 min, 经微孔滤膜(3.5.1)过滤, 根据实际浓度用 70% 甲醇溶液(3.2.2)适当稀释至线性范围内, 待测。

6.1.3 固体火锅底料、半固体火锅底料

称取 1 g 试样(精确至 0.001 g)于 50 mL 离心管中, 加入 4 mL 正己烷(3.1.4), 涡旋振荡 1 min, 再加入 25.0 mL 70% 甲醇溶液(3.2.2), 涡旋振荡 1 min, 超声提取 20 min, 9 000 r/min 离心 5 min, 取出下层有机相至另一 50 mL 离心管内, 加入 5 mL 正己烷(3.1.4), 涡旋振荡 1 min, 9 000 r/min 离心 5 min, 弃去上层正己烷, 吸取 3.0 mL 下层清液, 过固相萃取柱(3.5.2)及微孔滤膜(3.5.1), 弃去约 1 mL 流出液, 收集续滤液, 根据实际浓度用 70% 甲醇溶液(3.2.2)适当稀释至线性范围内, 待测。

6.2 测定

6.2.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下。

- 色谱柱: C_{18} 柱(2.1 mm \times 100 mm, 2.5 μ m), 或性能相当者。
- 流动相: A 为乙腈, B 为 0.1% 甲酸水溶液。梯度洗脱程序见表 1。
- 流速: 0.25 mL/min。
- 柱温: 35 $^{\circ}$ C。
- 进样量: 2 μ L。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	A 相/%	B 相/%
0.0	20	80
1.0	20	80
5.0	90	10
8.0	90	10
8.01	20	80
10.0	20	80

6.2.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下。

- 离子源: 电喷雾离子源(ESI 源)。
- 检测方式: 多反应监测(MRM)。
- 离子喷雾电压(IS): 5 500 V/−4 500 V。
- 雾化器压力(GS1): 55 psi(1 psi=6.895 kPa)。
- 辅助气压力(GS2): 60 psi。
- 气帘气(CUR): 30 psi。
- 碰撞气(CAD): 9 psi。

- h) 离子源温度(TEM):500 ℃。
- i) 其他质谱参数见表 2。

表 2 主要质谱参数

化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV	离子化模式
淫羊藿苷	675.1	513.2*	-145	-17	-
	675.1	367.3	-145	-47	-
金丝桃苷	463.0	300.1*	-155	-39	-
	463.0	271.0	-155	-58	-
补骨脂素	187.1	131.1*	120	33	+
	187.1	77.0	120	52	+

* 定量离子对。

6.2.3 定性测定

在相同试验条件下,测定试样和混合标准工作溶液,记录试样和混合标准工作溶液中淫羊藿苷、金丝桃苷和补骨脂素的色谱保留时间,若试样中检出与混合标准工作液(3.4.5)中淫羊藿苷、金丝桃苷、补骨脂素和保留时间一致的色谱峰(变化范围在±2.5%之内),且其定性离子与浓度相当的标准溶液中相应的定性离子的相对丰度相比,偏差不超过表 3 规定的范围,则可以确定试样中检出淫羊藿苷、金丝桃苷和补骨脂素。标准溶液液相色谱-串联质谱多反应监测色谱图见附录 B。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/%	>50	>20~50	>10~20	≤10
最大允许偏差/%	±20	±25	±30	±50

6.2.4 定量测定

将混合标准工作溶液(3.4.5)分别按仪器参考条件(6.2)进行测定,得到相应的标准溶液的色谱峰面积。以混合标准工作溶液的质量浓度为横坐标,以色谱峰的峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

将试样溶液(6.1.1、6.1.2、6.1.3)按仪器参考条件(6.2)进行测定,得到相应的试样溶液的色谱峰面积,根据标准曲线得到待测液中组分的质量浓度。

6.3 空白试验

除不加试样外,均按上述步骤进行。

7 结果计算

试样中淫羊藿苷、金丝桃苷和补骨脂素的含量按式(1)计算:

$$X = \frac{(c - c_0) \times V \times f \times 1\,000}{m \times 1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

X ——试样中各待测物的含量，液体试样单位为微克每升($\mu\text{g/L}$)，固体试样单位为微克每千克($\mu\text{g/kg}$)；

c ——由标准工作曲线中得出的溶液中各待测物的质量浓度，单位为纳克每毫升(ng/mL)；

c_0 ——由标准曲线计算得到的过程空白样品中某种组分的质量浓度，单位为纳克每毫升(ng/mL)；

V ——样液的提取体积，单位为毫升(mL)；

f ——试样制备过程中的稀释倍数；

1 000——换算系数；

m ——称样量，液体试样单位为毫升(mL)，固体试样单位为克(g)。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留 3 位有效数字。

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 15%。

9 其他

当试样量为 1.0 mL 时，试样中淫羊藿苷的检出限为 12 $\mu\text{g/L}$ 、定量限为 25.0 $\mu\text{g/L}$ ；金丝桃苷的检出限为 5 $\mu\text{g/L}$ 、定量限为 12.5 $\mu\text{g/L}$ ；补骨脂素的检出限为 0.5 $\mu\text{g/L}$ 、定量限为 1.25 $\mu\text{g/L}$ 。

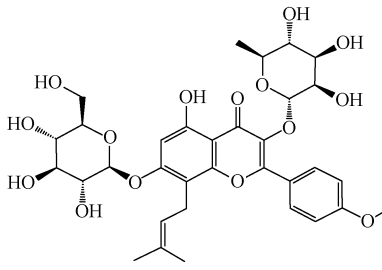
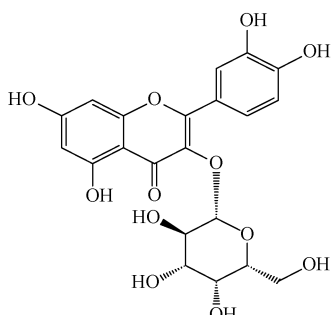
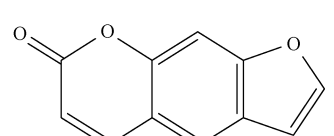
当试样量为 1 g 时，试样中淫羊藿苷的检出限为 12 $\mu\text{g/kg}$ 、定量限为 25.0 $\mu\text{g/kg}$ ；金丝桃苷的检出限为 5 $\mu\text{g/kg}$ 、定量限为 12.5 $\mu\text{g/kg}$ ；补骨脂素的检出限为 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 、定量限为 1.25 $\mu\text{g/kg}$ 。

附录 A

(资料性)

标准物质的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量、结构式

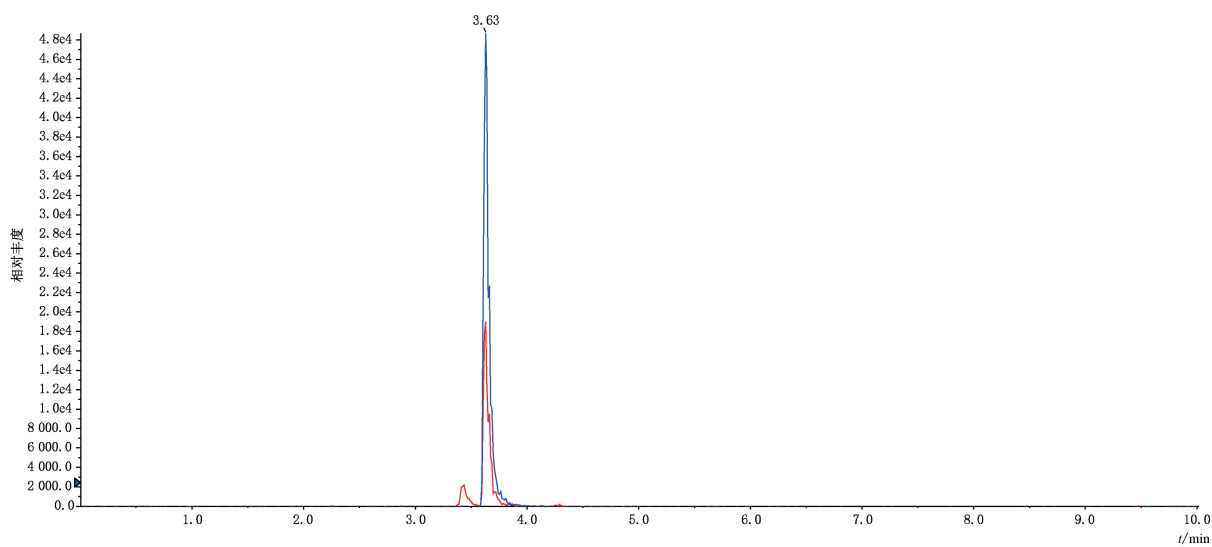
表 A.1 标准物质的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量、结构式

序号	中文名称	英文名称	CAS 号	分子式	相对分子质量	结构式
1	淫羊藿苷	Icariin	489-32-7	$C_{33}H_{40}O_{15}$	676.66	
2	金丝桃苷	Hyperoside	482-36-0	$C_{21}H_{20}O_{12}$	464.38	
3	补骨脂素	Psoralen	66-97-7	$C_{11}H_6O_3$	186.16	

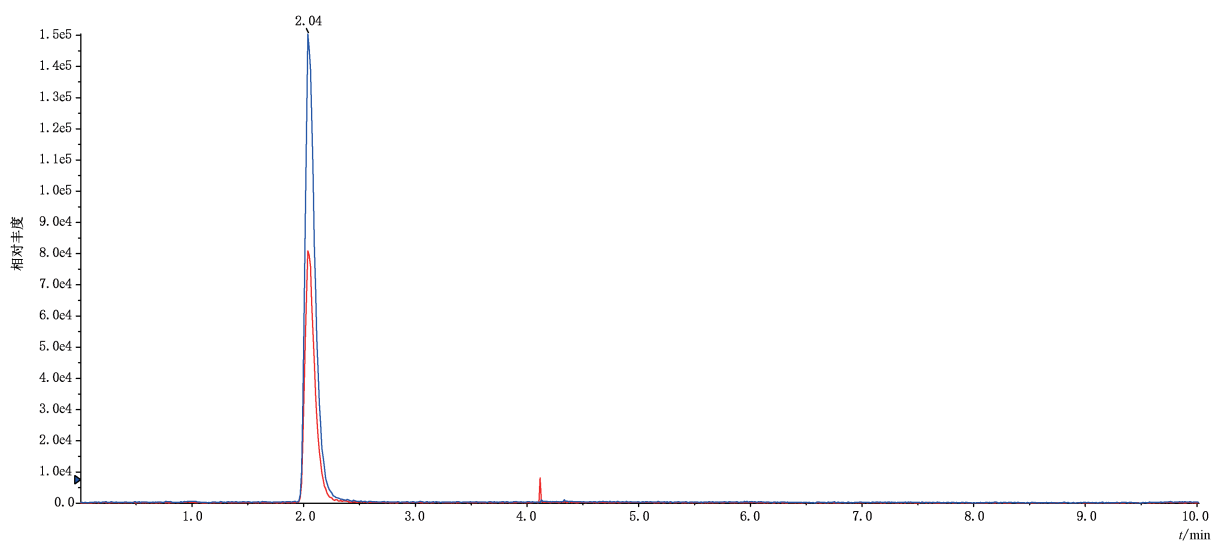
附录 B

(资料性)

补骨脂素、淫羊藿苷、金丝桃苷标准物质色谱图



a) 淫羊藿苷



b) 金丝桃苷

图 B.1 淫羊藿苷、金丝桃苷、补骨脂素液相色谱-串联质谱多反应监测色谱图

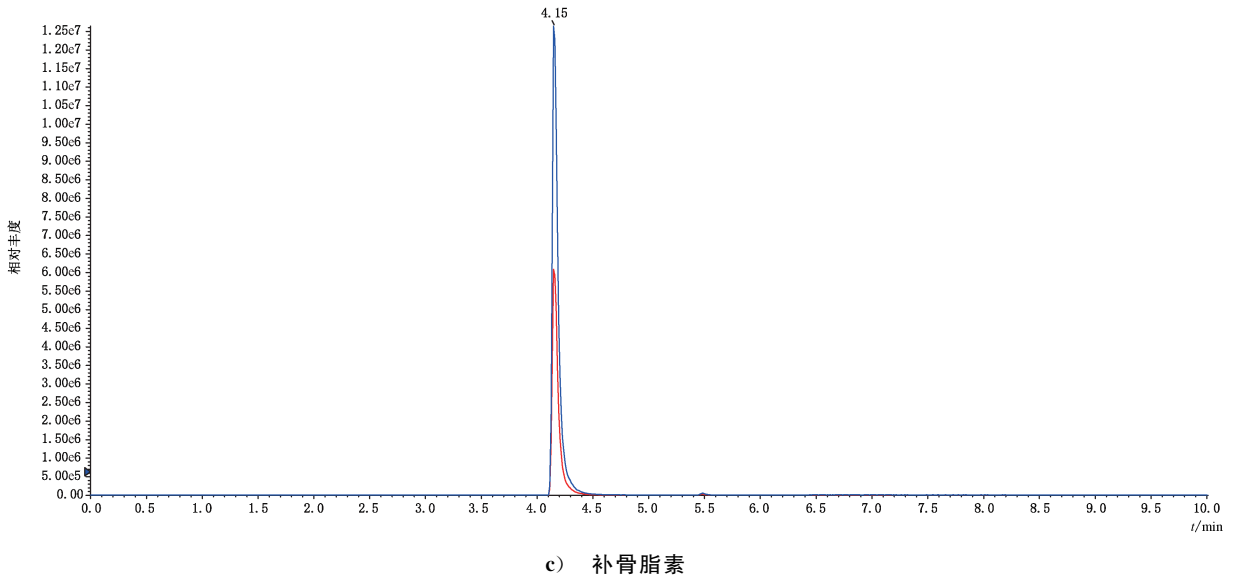


图 B.1 淫羊藿苷、金丝桃苷、补骨脂素液相色谱-串联质谱多反应监测色谱图 (续)

本方法起草单位:河北省食品检验研究院、清华大学、河南大学、四川省食品药品检验检测院、湖北省食品质量安全监督检验研究院。

本方法验证单位:石家庄市疾病预防控制中心、石家庄海关技术中心、广州质量监督检测研究院、石家庄市食品药品检验中心、北京市食品检验研究院(北京市食品安全监控和风险评估中心)。

本方法主要起草人:张岩、马俊美、王怡、范素芳、史国华、康文艺、李强、余晓琴、邵曼、马常阳、姚欢、王鸣秋、刘艳、范志勇、崔丽丽。